

【210】

| | |
|---------|---------------------------------------------|
| 氏名 | 衣 田 圭 宏 |
| 授与した学位 | 博 士 |
| 専攻分野の名称 | 歯 学 |
| 学位授与番号 | 博甲第 1722 号 |
| 学位授与の日付 | 平成10年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当） |
| 学位論文題名 | 部分精製骨形成タンパク質-I型コラーゲン複合体による異所性骨誘導過程の電子顕微鏡的研究 |
| 論文審査委員 | 教授 滝川正春 教授 鈴木一臣 教授 永井教之 |

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

骨形成タンパク質（Bone morphogenetic protein : BMP）は、異所性に硬組織を誘導する成長因子として注目されている。BMPによる異所性骨形成過程は以前から、組織学的に内軟骨性骨化様の過程であるといわれ、その詳細が検討されている。しかし、最近の研究では、用いる担体の種類によっては、軟骨を介さない膜性骨化様の過程を示すことが報告されている。完山（1996）は、BMP-I型コラーゲン複合体を用いて、異所性に膜性骨化様の骨形成が生じることを報告したが、その骨形成の特徴や担体の役割については明らかにされていない。そこで本研究は、BMPによる膜性骨化様の骨形成過程を、特に初期石灰化に着目して電顕的に検討を行った。

【材料と方法】

本研究に用いたBMPはウシ骨粉を洗浄、脱脂、脱灰、4Mグアニジン塩酸で抽出、限外濾過器にて分子量を1～10万に限定し、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにて精製した部分精製BMPである。担体には、ウシ真皮由来ペプシン可溶化I型コラーゲン（高研社製）を用いた。

実験動物には、4週齢ウィスター系雄性ラット60匹を用い、部分精製BMP 2mg と担体 10mg の複合体3点と、対照として担体 10mg のみ1点を各ラットの背部皮下に埋入した。埋入後3日、5日、7日、10日、14日、21日にラットを屠殺、埋入物を摘出した。摘出材料は半割して、一方は4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定、通法に従いパラフィン包埋、4μm切片を作製、H・E染色を施して光顕的に観察を行った。もう一方は細切し、2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒドで浸漬固定、通法に従いエポン樹脂包埋、電子染色を施して透過型電子顕微鏡で観察を行った。

また、担体及び複合体の微細構造を観察するために、複合体、担体のみにについては、走査型電子顕微鏡を用いて観察するとともに、透過型電子顕微鏡で観察を行った。

【結果と考察】

I. 担体及び複合体の微細構造

担体は細線維状構造を有しており、コラーゲン線維に特有の周期構造は認められなかった。複合体では、担体の細線維状物質内にBMPを含む精製物質と思われる高電子密度の類円形、紡錘形の直径約 $0.05 \sim 0.4 \mu\text{m}$ の顆粒状物質が分布していた。

II. 複合体埋入後の異所性骨形成過程について

1) 埋入後3～5日（細胞増殖期）

担体周囲に、紡錘形、卵円形の間葉系細胞が増殖、密集していた。間葉系細胞内の小器官は軽度に発達し、またマクロファージによる担体細線維状物質の貪食も認められた。

2) 埋入後7～10日（仮骨形成期）

複合体周囲では、骨芽細胞が担体細線維束状物質周囲に認められ担体に添加性に類骨の形成がみられた。細胞外形が不規則で細胞内小器官の発達の乏しい骨芽細胞が認められた。類骨の形成が進むとともに類骨中に大小の石灰化巣の形成が認められた。一部の担体上にも石灰化巣の形成が認められた。

3) 埋入後14～21日（骨改造期）

複合体表層部では、線維性骨が形成され、担体は石灰化骨基質の一部を構成していると考えられた。一部では破骨細胞による骨吸収が認められた。

III. 複合体埋入後7～10日に観察される初期石灰化は、核形成の構造の違いにより3つのタイプに分けられた。

1) 骨芽細胞が形成した類骨中の基質小胞内に結晶沈着が認められるタイプであり、生理的な初期石灰化と考えられた。担体は類骨形成の足場をなしていると考えられた。

2) 類骨と担体の境界部の顆粒状物質に結晶沈着が認められるタイプで、細胞内小器官の発達の乏しい骨芽細胞、幅の狭いコラーゲン線維層が形成され、類骨内のコラーゲン密度や太さが不規則で基質小胞がほとんど存在しない特徴を示した。担体は類骨様の役割を果たしていると考えられた。

3) 担体の細線維状物質に結晶沈着が認められるタイプで、骨芽細胞が関与しない石灰化と考えられた。この結晶沈着に類似した像は、担体のみを埋入した場合の埋入後14～21日における担体細線維上にも観察された。

【結論】

1) 部分精製BMPとI型コラーゲン担体による膜性骨化様の異所性骨形成では、骨芽細胞の不規則な形態、類骨の不完全な形成が認められ、骨形成における石灰化では複数の石灰化開始過程が存在しており、生理的な膜性骨化とは異なる特徴が示された。

2) 初期石灰化はその核形成の場の違いにより基質小胞開始型、顆粒状物質開始型、細線維状物質開始型の3つのタイプに分けられ、顆粒状物質や担体の細線維状物質が結晶沈着の核形成に関与していることが示された。

3) I型コラーゲン担体の周囲に類骨が形成されたことから、担体はBMPの徐放性効果のみならず、類骨形成の足場、初期石灰化の基質および石灰化骨基質の一部として骨形成に関与することが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、ウシ骨由来部分精製骨形成タンパク質（BMP）-I型アテロコラーゲン担体を用いて、ラット背部皮下に膜性骨化様の骨形成を誘導し、その過程における細胞の動態および担体の役割について超微形態学的検討を加えたものである。

本研究の結果から、部分精製BMPによる膜性骨化様の異所性骨形成では、骨芽細胞が不規則な形態を示し類骨形成の不完全な部位が存在すること、また、初期石灰化の核形成の場として、基質小胞開始型、顆粒状物質開始型、細線維状物質開始型の3つの型が存在することなど、生理的な膜性骨化とは異なる特徴が示された。I型アテロコラーゲン担体においては、添加性に類骨形成がみられること、また、類骨のみならず担体においても石灰化が認められることなどから、I型アテロコラーゲン担体は骨形成に関与することが示唆された。

これらの知見は、BMPによる膜性骨化様の骨形成過程の解明およびより優れた担体の開発に向けて重要な情報を与え、有用な業績であると認める。

よって、本申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。